

59-219270

Dec. 10, 1984

U.S. Patent & Trademark Office

METHOD AND REAGENT FOR STABILIZATION OF TETRAZOLIUM SALT WITH CYCLODEXTRIN

INVENTOR: AYUHEKO YAMADA, ET AL. (J)

ASSISTANT INVENTOR: JUNYA KOGURE (J)

ATTORNEY OR AGENT:

DATE RECEIVED: May 20, 1983

DATE FILED: May 20, 1983

APL. NO. 500,000

REG. DATE: Apr. 17, 1984

CHIEF: 5070 15704, CO7D 417*04; C12Q L126; G01N 31*32; G01N 33*50

ABSTRACT:

PURPOSE: To prevent the loss of stability of a tetrazolium salt caused by thiol compound, etc., and to enable the use of the salt widely as a reagent.

20 DEC 24 13:17:50

U.S. Patent & Trademark Office

F0142

59-219270

Dec. 10, 1984

L43: 5 of 5

METHOD AND REAGENT FOR STABILIZATION OF TETRAZOLIUM SALT WITH CYCLODEXTRIN

for the accurate colorimetry of a reducible substance, by using .beta.- and/or .gamma.- cyclodextrin as active component.

CONSTITUTION: The tetrazolium salt having the partial structure of formula I, e.g. the compound of formula II (R^{sup.1}, R^{sup.2} and R^{sup.3} are organic residue) [open bracket] preferably the compound of formula III (X^{sup.1} and X^{sup.2} are -NO₂ or H; X^{sup.3} is -OCH₃, -I or H), etc. [close bracket] is stabilized by using a component containing .beta.- cyclodextrin and/or .gamma.- cyclodextrin as active component. The preferable concentration of the above stabilizing component is usually 0.1 approx. 0.5W/V% for .beta.- cyclodextrin and 0.1 approx. 3W/V% for .gamma.- cyclodextrin. Although the formazan compound produced by the reduction of the tetrazolium salt has high dyeability to glass, etc., however, the dyeing can be effectively prevented by the use of gelatin.

20 DEC 24 13:17:52

U.S. Patent & Trademark Office

F0142

5 Int. Cl.¹
 C 07 D 257/04
 417/04
 C 12 Q 1/26
 G 01 N 31/22
 33/50

識別記号

府内整理番号
 7132-4C
 7431-4C
 8213-4B
 7621-2G
 E 8305-2G

⑪ 公開 昭和59年(1984)12月10日

発明の数 2
 審査請求 未請求

(全 16 頁)

⑫ シクロデキストリンによるテトラゾリウム塩の安定化方法及び安定化用試薬

東京都板橋区赤塚3丁目17番10号

⑬ 特 願 昭58—95185

⑭ 発明者 花田寿郎

⑮ 出 願 昭58(1983)5月30日

川越市大字南大塚784

⑯ 発明者 山西一彦

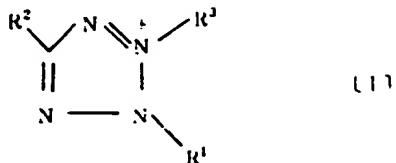
⑰ 出願人 和光純薬工業株式会社

大阪市東区道修町3丁目10番地

明細書

1. 発明の名称

シクロデキストリンによるテトラゾリウム塩の安定化方法及び安定化用試薬



(但し、R¹、R²及びR³は有機残基を表わす。)

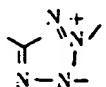
2. 特許請求の範囲

(1) メーシクロデキストリン又はアーシクロデキストリンを有効成分として用いる、部分構造

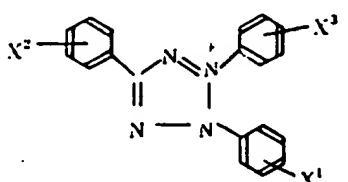


を有するテトラゾリウム塩の安定化方法。

(2) 部分構造



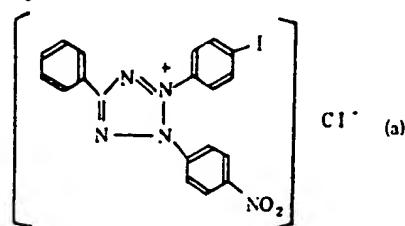
を有するテトラゾリウム塩が、一般式(I)で示されるモノテトラゾリウム塩である、特許請求の範囲第1項記載の安定化方法。



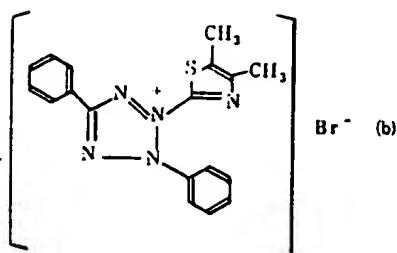
(但し、X¹及びX²は、-NO₂又は-Hを表わし、X³は、-OC(=O)CH₃、-I又は-Hを表わす)

(3) 一般式(II)で示されるモノテトラゾリウム塩が構造式(I)で示されるモノテトラゾリウ

ム塩である特許請求の範囲第3項記載の安定化方法。



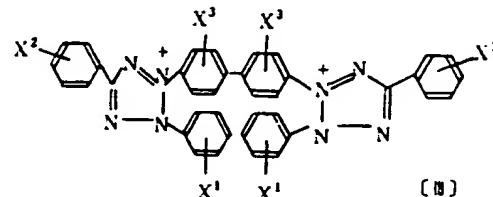
(5) 一般式〔1〕で示されるモノテトラブリウム塩が、構造式(b)で示されるモノテトラブリウム塩である特許請求の範囲第2項記載の安定化方法。



(6) 部分構造 を有するテト

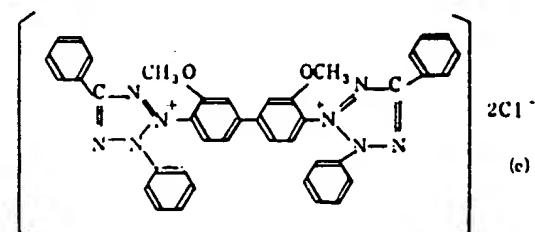
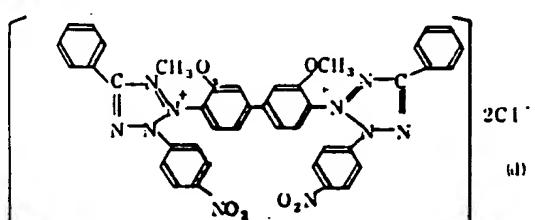
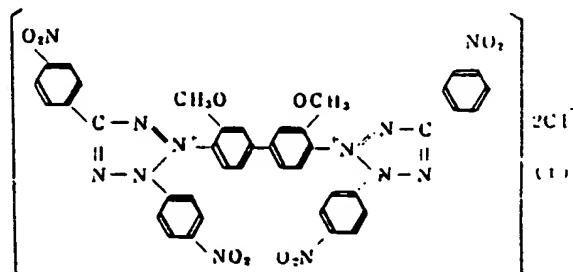
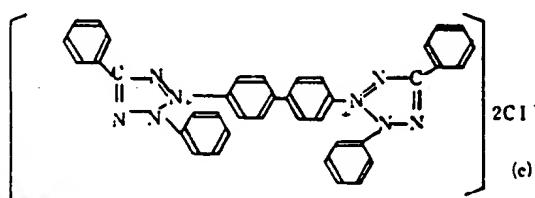


ラブリウム塩が、一般式〔2〕で示されるジテトラブリウム塩である特許請求の範囲第1項記載の安定化方法。



(但し、X¹及びX⁴は、-NO₂又は-Hを表わし、X²は-OCH₃、-I又は-Hを表わす。)

(7) 一般式〔3〕で示されるジテトラブリウム塩が、構造式(c)乃至(f)で示されるジテトラブリウム塩の1である特許請求の範囲第6項記載の安定化方法。



(8) 液液中にメーシクロデキストリンはターシクロデキストリンを存在させる、特許請求の範囲第1項、第2項、第3項、第4項、第5項、第6項、又は第7項記載の安定化方法。

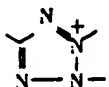
(9) 液液中のメーシクロデキストリンの濃度が0.01~1.5重量/容積%である特許請求の範囲第8項記載の安定化方法。

(10) 液液中のターシクロデキストリンの濃度が0.01~1.0重量/容積%である特許請求の範囲第8項記載の安定化方法。

(11) 液液中のメーシクロデキストリン及びターシクロデキストリンの濃度が、メーシクロデキストリン0.01~1.5重量/容積%、ターン

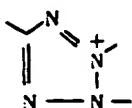
クロデキストリン0.01~10重量/容量%の範囲で任意の比率に混合した濃度である特許請求の範囲第8項記載の安定化方法。

(12) 液がチオール化合物及び部分構造



を有するテトラゾリウム塩及びヨーシクロデキストリン又はヨーシクロデキストリンを含有して成る、安定化されたテトラゾリウム塩溶液である、特許請求の範囲第8項、第9項、第10項又は第11項記載の安定化方法。

(13) チオール化合物及び部分構造

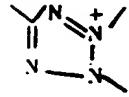


を有するテトラゾリウム塩及びヨーシクロデキストリン又はヨーシクロデキストリンを含有して成る、安定化されたアトラゾリウム塩溶液が、基質に作用してスーパー・オキサイド

は酸化酵素である、特許請求の範囲第13項又は第14項記載の安定化方法。

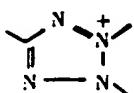
(17) 基質又は酸化酵素が体液成分である、特許請求の範囲第16項記載の安定化方法。

(18) ヨーシクロデキストリン又はヨーシクロデキストリンを有効成分として含有する部分構造

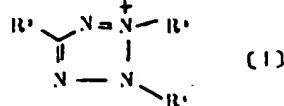


を有するテトラゾリウム塩の安定化用試薬。

(19) 部分構造



を有するテトラゾリウム塩が、一般式(1)で示されるモノテトラゾリウム塩である、特許請求の範囲第18項記載の安定化用試薬。



イオンを生成させる酸化酵素を含有する特許請求の範囲第12項記載の安定化方法。

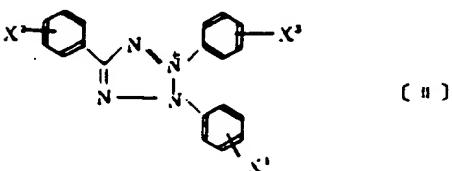
(14) グルコース、コレステロール、グリセロール、グリセロール脂肪酸エステル、コリン、アシルCoA、ビルビン酸、尿酸、キサンチン又は乳酸を基質とし、それらの基質に作用する酸化酵素が各々グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、グリセロールオキシダーゼ、グリセロール脂肪酸エステルオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、アシルCoAオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、ウリカーゼ、キサンチンオキシダーゼ又は乳酸オキシダーゼである、特許請求の範囲第13項記載の安定化方法。

(15) チオール化合物が、還元型グルタチオン、チオグリコール酸、メルカブトエタノール、チオサリチル酸、システアミン、システイン、ジメルカブトコハク酸である特許請求の範囲第12項又は第13項記載の安定化方法。

(16) 基質又は酸化酵素が被検試料中の基質又は

(但し、R¹、R²及びR³は有機残基を表わす。)

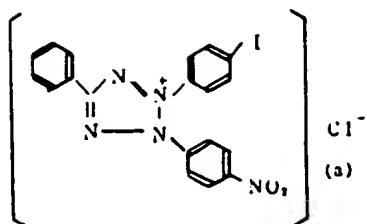
(20) 一般式(1)で示されるモノテトラゾリウム塩が、一般式(1)で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第19項記載の安定化用試薬



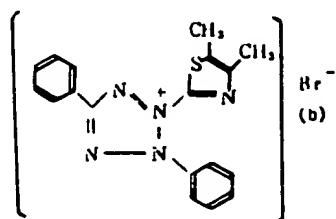
(但し、X¹及びX²は、-NO₂又は-Hを表わし、X³は、-OCH₃、-I又は-Hを表わす。)

(21) 一般式(1)で示されるモノテトラゾリウム塩が構造式(a)で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第20項記載の安定化用試薬。

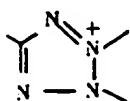
水の範囲第1~8項記載の安定化用試薬。



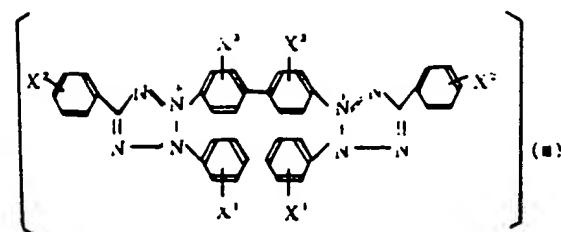
(22) 一般式〔1〕で示されるモノテトラゾリウム塩が、構造式(b)で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第1~9項記載の安定化用試薬。



(23) 部分構造

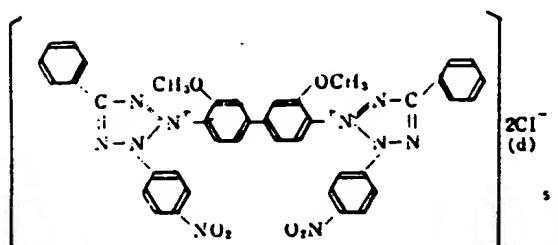
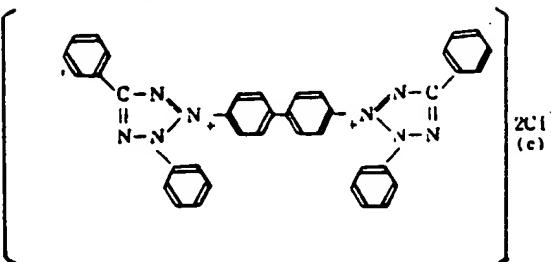


を有するテトラゾリウム塩が、一般式〔1〕で示されるジテトラゾリウム塩である特許請

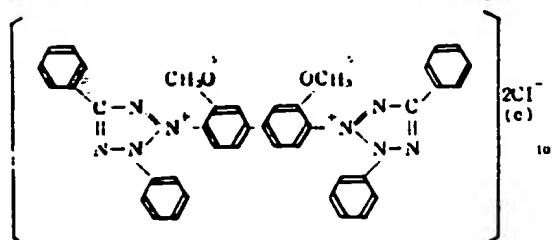


(但しX'及びX''は、-NO₂又は-Clを表わし、X'は-OC(=O)CH₃、-I又は-Hを表わす。)

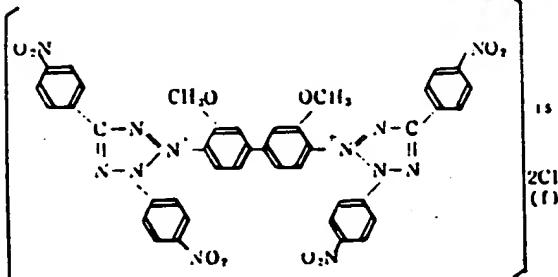
(24) 一般式〔1〕で示されるジテトラゾリウム塩が、構造式(c)乃至(f)で示されるジテトラゾリウム塩の1である特許請求の範囲第2~3項記載の安定化用試薬。



(25) 液相中にメーシクロデキストリン又はアーシクロデキストリンを存在させる、特許請求の範囲第1~8項、第1~9項、第2~10項、第2~11項、第2~12項、第2~13項、又は第2~14項記載の安定化用試薬。



(26) 液相中のメーシクロデキストリンの濃度が0.01~1.5重量/容積%である特許請求の範囲第2~5項記載の安定化用試薬。



(27) 液相中のアーシクロデキストリンの濃度が0.01~1.0重量/容積%である特許請求の範囲第2~5項記載の安定化用試薬。

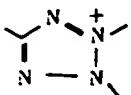
(28) 液相中のメーシクロデキストリン及びアーシクロデキストリンの濃度が、メーシクロデキストリン0.01~1.5重量/容積%、アーシクロデキストリン0.01~1.0重量/容積%の範囲で任意の比率に混合した濃度であら特許請求の範囲第2~5項記載の安定化用試薬。

(29) 液相が、ナオール化合物及び部分構造



を行するテトラゾリウム塩及びテーシクロデキストリン又はテーシクロデキストリンを含有して成る、安定化されたテトラゾリウム塩溶液である、特許請求の範囲第25項、第26項、第27項又は第28項記載の安定化用試薬。

(30) テオール化合物及び部分構造



を行するテトラゾリウム塩及びテーシクロデキストリン又はテーシクロデキストリンを含有して成る、安定化されたテトラゾリウム塩溶液が、基質に作用してスーパーオキサイドイオンを生成させる酸化酵素を含有する特許請求の範囲第29項記載の安定化用試薬。

(31) グルコース、コレステロール、グリセロ

ール、グリセロール過酸エステル、コリン、アシルCoA、ビルビン酸、尿酸、キサンチン又は乳酸を基質とし、それらの基質に作用する酸化酵素が各々グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、グリセロールオキシダーゼ、グリセロール過酸エステルオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、アシルCoAオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、ウリカーゼ、キサンチンオキシダーゼ又は乳酸オキシダーゼである特許請求の範囲第30項記載の安定化用試薬。

(32) テオール化合物が、還元型グルタチオン、テオグリコール酸、メルカブトエタノール、テオサリチル酸、システアミン、システイン、ジメルカブトコヘク酸である特許請求の範囲第30項又は第31項記載の安定化用試薬。

(33) 基質又は酸化酵素が被検試料中の基質又は酸化酵素である、特許請求の範囲第30項又は第31項記載の安定化用試薬。

(34) 基質又は酸化酵素が体液成分である、特

許請求の範囲第33項記載の安定化用試薬。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、シクロデキストリンを有効成分とする、テトラゾリウム塩の安定化方法及び安定化用試薬に関するものである。

ニトロテトラゾリウムブルー（以下NO₂-TBと略記する。）等のテトラゾリウム塩類は一般に酸化還元電位が低く、還元されるとモノホルマザン化合物又はジホルマザン化合物のようなホルマザン化合物を生じ褐色～青色を呈するので、臨床化学、製薬化学、生化学、食品化学の分野に於て、脱水素酵素の測定用試薬として或は還元性補酵素やスーパーオキサイドイオンのような還元性物質の比色定量用試薬として広く用いられている。

しかしながら、テトラゾリウム塩類の水溶液は一般に安定ではあるが、テオール化合物等の還元性物質が存在すると次第に分解し、これに褐色を生じるか、試薬盲検値の経時的上昇をきたし、因

る原因となる。

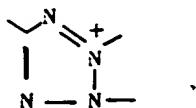
テトラゾリウム塩を用いる、被検試料中の体液成分の測定例を挙げると、スーパーオキサイドイオンO₂⁻を定量的に生成する反応で生成したスーパーオキサイドイオンにより定量的にテトラゾリウム塩類が還元されて生成するホルマザン化合物の呈色を定量する方法及び試薬がある。

このようなスーパーオキサイドイオンの生成反応の例として、酸化酵素を基質に作用させ、スーパーオキサイドイオンを生成させる酵素反応があるが、これは具体的な実施に当り、好ましくは、テオール化合物、ペルオキシダーゼ、フェノール化合物の共存下で、酸化酵素を基質に作用させ、スーパーオキサイドイオンを生成させる酵素反応により、目的成分を定量するものである。このスーパーオキサイドイオンをテトラゾリウム塩と定量的に反応させて、テトラゾリウム塩が還元されて生成するホルマザン化合物の呈色を定量的に測定する場合は、テオール化合物の存在により、それらテトラゾリウム塩が不安定となり、テオール化

合物及びテトラゾリウム塩を含有する溶液が着色して、目的成分の定量的測定を妨害する問題点が生じる。

本発明者は、上記問題点を解決すべく試験研究の結果、テトラゾリウム塩類を含有する溶液に、特定のシクロデキストリン、即ち、ターシクロデキストリン又はアーシクロデキストリンを共存させることにより、テトラゾリウム塩が安定化されることを見い出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、ターシクロデキストリン又はアーシクロデキストリンを有効成分として用いる部分構造



を有するテトラゾリウム塩の安定化方法及び試薬である。

ターシクロデキストリンにはそのような作用、効果はなく、ターシクロデキストリン又はアーシクロデキストリンにのみ、そのような作用、効果

が認められる。

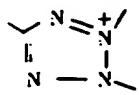
これは、一般的には、それらターシクロデキストリン又はアーシクロデキストリンによるテトラゾリウム塩の包接作用によるものであると考えることができる。このようにしてターシクロデキストリン又はアーシクロデキストリンによって安定化されたテトラゾリウム塩であっても、スーパーオキサイドイオンによるテトラゾリウム塩の還元反応は、充分速い反応速度で進行し、還元反応で生成したホルマザンの呈色を測定することにより、充分な感度でスーパーオキサイドイオンを定量的に測定することができる。従って、ターシクロデキストリン又はアーシクロデキストリンを添加しない場合と発色率の変化はなく、しかも、育検値の上昇は抑制される。

又、本発明に関して用いるテトラゾリウム塩が還元されて生成するホルマザン化合物は、ガラス材質、プラスチック材質などの被染体に強い染着性を有し、ホルマザン化合物による被染体の染着現象を惹起し、結果として、そのようなホルマザ

ン化合物が吸光度測定用の被染体であるセルなどに染着して誤差を生じるなどの問題点を有する。

この問題は、ゼラチンを有効成分として用いることにより解決された。即ち、ゼラチンは、テトラゾリウム塩から生成するホルマザン化合物の染着力を効果的に抑制し、同テトラゾリウム塩が還元されて生成する色素であるホルマザン化合物による被染体の染着を効果的に防止する効果を有するため、テトラゾリウム塩を含有する溶液にゼラチンを存在させると、そのような染着は効果的に防止される。

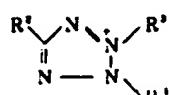
本発明は、ターシクロデキストリン又はアーシクロデキストリンによって、部分構造



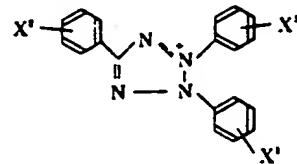
を有するテトラゾリウム塩を安定化させる以外、そのようなテトラゾリウム塩が還元されて生成するホルマザン化合物による染着をゼラチンを有効成分として用いて効果的に防止する以外は、

自体公知の方法及び試薬によつても容易に実施をことができる。

部分構造 を有するテトラゾリウム塩の典型のは、有機残基R¹、R²、及びR³をその置換基として有する、一般式(Ⅰ)

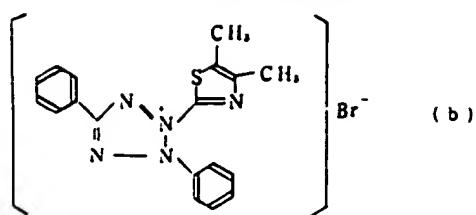


で示されるモノテトラゾリウム塩であり、そのようなモノホルマザン化合物(Ⅰ)として代表的なものに一般式(Ⅱ)

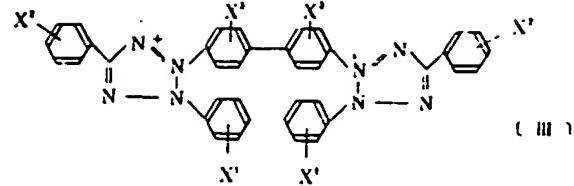


(但しX¹及びX²は、-NO₂又は-HO⁻を表わし、X³は、-OC(=O)CH₃、-I又は-Hを表わす。) で示さ

れるモノテトラゾリウム塩や構造式(b)

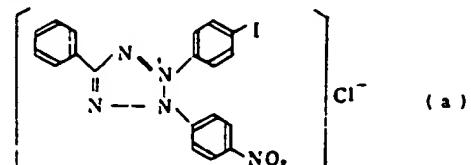


(b)



(c)

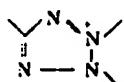
で示されるモノテトラゾリウム塩があり、一般式
(II)で示されるモノテトラゾリウム塩の一例と
して構造式(a)



(a)

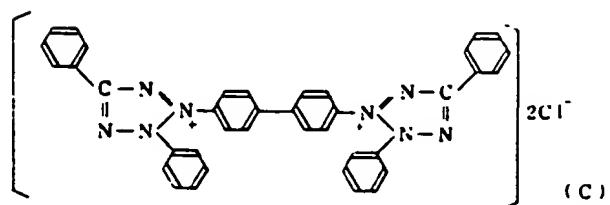
で示されるモノテトラゾリウム塩がある。

又、部分構造

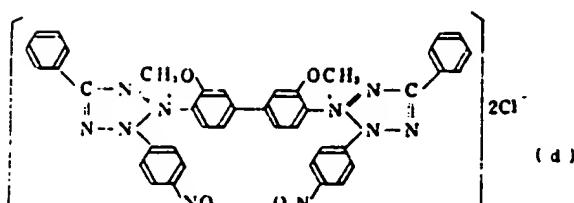


を有するテトラゾリウム塩の他の典型的な1つは一般
式(III)

(但しX'及びX''は、-NO₂又は-Hを表わし、
X'は、-OCH₃、-I又は-Hを表わす。)で示さ
れるジテトラゾリウム塩であり、そのような一般
式(IV)で示されるジテトラゾリウム塩の例とし
て構造式(c)乃至(i)で示されるジテトラゾリウム塩
がある。

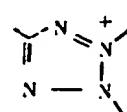


(c)

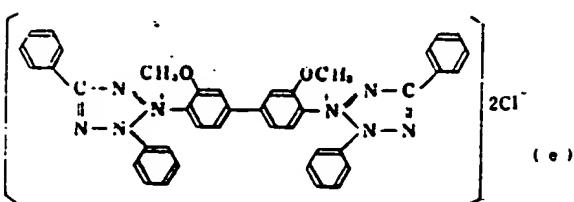


(d)

又、部分構造

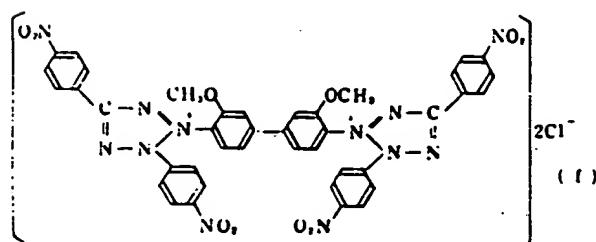
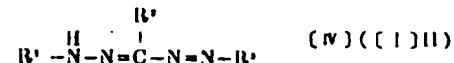


を有するテ



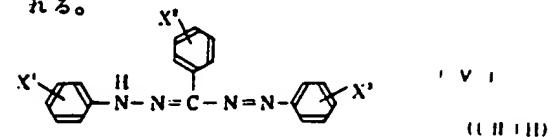
(e)

トライウム塩が還元されて生成する部分構造
-H-N=N-C=N-N- を有するホルマザン化
合物であって一般式(I)で示されるモノテトラゾ
リウム塩から生成するモノホルマザン化合物は、
一般式(V) ((I)H) で示される。

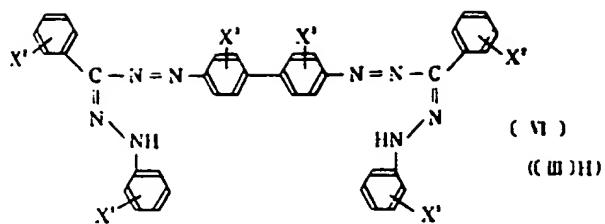


(f)

又、一般式(I)で示されるモノテトラゾリウ
ム塩又は一般式(II)で示されるジテトラゾリウ
ム塩から生成するホルマザンは、各々一般式(V)
((I)H)、一般式(VI) ((II)H) で示さ
れる。

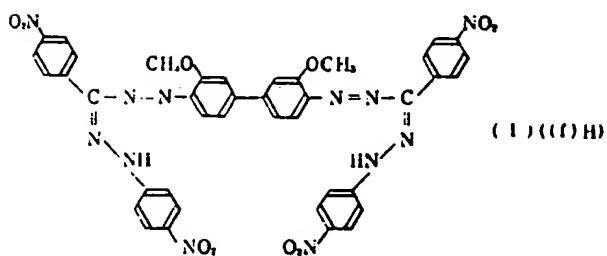
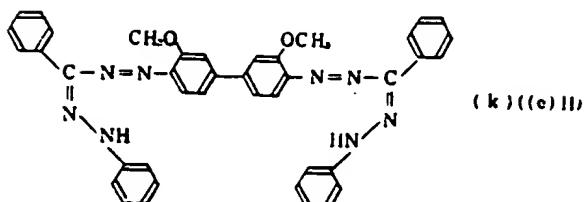
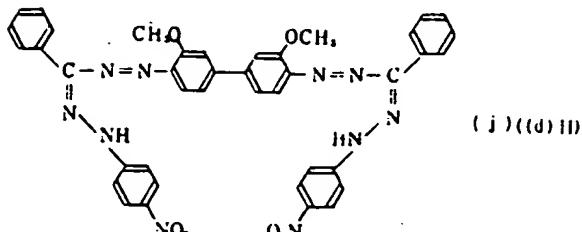
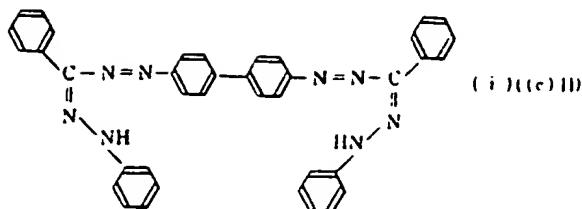
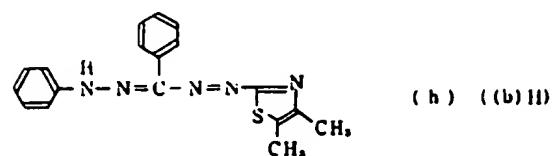
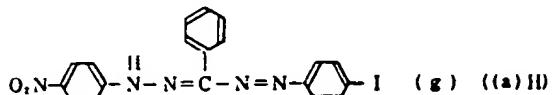


(I)H (II)H



(但し、 X' 及び X'' は、-NO₂ 又は -H を表わし、
 X' は、-OC(=O)R₁ 又は -I 又は -Cl を表わす。)

又、構造式(a)乃至(l)で示されるテトラゾリウム塩が還元されて生成するホルマゼン化合物は、構造式(u) ((a)H) 乃至(l) ((l)H) で示される。



テトラゾリウム塩を安定化するヨーシクロデキストリン又はヨーシクロデキストリンの濃度について述べると、溶液中、ヨーシクロデキストリンを用いる濃度の一例としては、溶液中、通常、0.01～1.5重量／容量%、ヨーシクロデキストリンを用いる濃度の一例としては、同じく、溶液中、通常、0.01～1.0重量／容量%であり好ましい一例としては、通常、ヨーシクロデキストリンは0.1～0.5重量／容量%、ヨーシクロデキストリンは0.1～3重量／容量%が用いられる。又、ヨーシクロデキストリンとヨーシクロデキストリンを上記濃度で任意の比率で混合して用いてらよい。

本発明に於て特に効果的なゼラチンは、その平均分子量が20000~150000であるようなゼラチンであって、その分子量が例えば1000とか2000であるような水溶性ゼラチンについてはそのような効果は特に効果的ではないようみえる。しかしながら、本発明に係るゼラチンは、その平均分子量が20000~150000であるようなゼラチンに限定されるものではなく、これら、その平均分子量が20000~150000であるようなゼラチンと同等な作用を有するものであれば、いずれのものでもよい。なお、その由来は、動物の骨や皮などに由来するものが市販されているが、これらに限られるものではない。溶液中で効果的なゼラチン濃度は、通常、一例、0.1~0.7重量/容積%、好ましくは、一例、0.2~0.5重量/容積%である。

又、著質に作用してスーパーオキサイドイオン O_2^- を生成させる酸化酵素による酵素反応の一例としては、著質がグルコース、コレステロール、ブリセロール、グリセロール脂肪エステル、コリン、アシン CoA、ビルビン酸、尿酸、キサンチン

又は乳酸であり、これらの基質に作用する酸化酵素が各々グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、グリセロールオキシダーゼ、グリセロール脂肪酸テルオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、アシルCoAオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、ウリカーゼ、キサンテンオキシダーゼ又は乳酸オキシダーゼ等が挙げられる。このとき、共存させるチオール化合物の一例として、還元型アルタチオン、チオグリコール酸、メルカプトエタノール、チオサリチル酸、システィミン、システィン又はジメルカブトコハク酸が挙げられる。

本発明は、ターシクロデキストリン又はターシクロデキストリンを有効成分として用いることにより、テトラゾリウム塩を安定化する方法及び試薬を提供するものであり、特に、基質に酸化酵素を作用させてスーパーオキサイドイオン O_2^- を生成させる反応の具体的実施に当り存在させるチオール化合物によるテトラゾリウム塩の不安定化の現象を効果的に防止する技術を提供するものであつ

て、その結果、そのような反応を適用して被検試料中の目的成分(例えば、体液成分)を定量する測定の試薬盲検値の上昇を効果的に抑制するなどを含めて、一般に、テトラゾリウム塩が還元されて生成するホルマザン化合物の呈色を測定する測定法及び試薬の臨床診断法、製薬、化学、生化学、食品化学の分野に於ける適用を極めて容易ならしめる点に於て斯量に貢献する所、極めて大なるものがある。

以下に本発明に係る実施例を述べるがこれに限定されるものではない。

実施例1 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：各々、 NO_2-TB が20mM、フェノールが0.01%、トリトンX-100が0.1%、ベオキシダーゼ(東洋精機製)が300u/ml、コレステロールオキシダーゼ(天野製薬製)が15u/ml、グルタチオン(還元型)が20mM、ゼラチンが0.5%、ターシクロデキストリンが0.2%の濃度になるよう、0.1Mトリス緩衝液(pH 8.0)にこれらを溶解した液を発色試液とする。

血清遊離コレステロールの測定：血清5.0mlをとり、これに発色試液3mlを加えて、37℃恒温槽中10分間加温後水を対照として波長560nmにおける吸光度を測定する。別に、血清の代りにイオン交換水を用いて同様に操作して求めた吸光度を試薬盲検値とする。

血清の代りに、コレステロールの200mMなるイソプロパノール溶液(標準液)を用いて同様に操作して標準の吸光度を求める。次式により血清中の遊離コレステロール濃度を算出する。

$$\frac{E_s - E_b}{E_{std} - E_b} \times 200 \text{ mM}$$

E_s ：血清を用いたときの吸光度

E_b ：試薬盲検値

E_{std} ：標準液を用いたときの吸光度

比較例1 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：実施例1の発色試液からゼラチンとターシクロデキストリンを除いた発色試液を調製

する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例1と同じ。

実施例1と比較例1の測定結果比較表

比較表 1

| 試 液 % | 実施例1 (mM) | 比較例1 (mM) |
|-------------|--------------|--------------|
| 1 | 44.3 | 43.9 |
| 2 | 32.5 | 32.8 |
| 3 | 66.8 | 66.5 |
| 4 | 44.0 | 44.0 |
| 5 | 59.8 | 59.5 |
| 6 | 48.9 | 49.0 |
| 7 | 35.5 | 36.0 |
| 8 | 40.2 | 40.0 |
| 9 | 39.3 | 39.1 |
| 10 | 47.7 | 47.4 |
| 平均 | 45.90 | 45.85 |

比較表 2

試葉盲検値の比較

| 項目 | 例 | 実施例1 | 比較例1 |
|-----------------|---|-------|-------|
| 560 nmの吸光度(水対照) | | 0.076 | 0.183 |

比較表 3

コレステロール標準液呈色度の比較

| 項目 | 例 | 実施例1 | 比較例1 |
|---------------------|---|-------|-------|
| 560 nmの吸光度(Estd-Es) | | 1.267 | 1.271 |

比較表 4

室温保存における発色試液の経時変化

| 保存時間 | 例 | 実施例1 | 比較例1 |
|------|---|-----------|------|
| 0時間 | | 澄明 | 澄明 |
| 18時間 | | 濁り及び少量の沈殿 | |
| 48時間 | | 濁り及び大量の沈殿 | |
| 72時間 | | 濁り及び大量の沈殿 | |

実施例1と実施例2の測定結果比較表

比較表 1

試葉盲検値の比較

| 項目 | 例 | 実施例1 | 実施例2 |
|-----------------|---|-------|-------|
| 560 nmの吸光度(水対照) | | 0.076 | 0.081 |

比較表 2

室温保存における発色試液の経時変化

| 保存時間 | 例 | 実施例1 | 実施例2 |
|------|---|------|------|
| 0時間 | | 澄明 | 澄明 |
| 18時間 | | 澄明 | 澄明 |
| 48時間 | | 澄明 | 澄明 |
| 72時間 | | 澄明 | 澄明 |

比較表 5

ガラスセルに対する染着性

| 項目 | 例 | 実施例1 | 比較例1 |
|----|---|------|-------------|
| 結果 | | 染着無し | セル全体が淡紫色に染着 |

コレステロール標準液の呈色液をガラスセルに入れ18時間室温に放置後板を捨てて水洗し乾燥して染着度を観測した。

比較表 1, 2, 3, 4, 5 から明らかのように、ゼラチンも、マーシクロデキストリンも、酵素法によるコレステロールの定量には全く影響を与せず、これらは、試葉盲検値の上昇を効果的に抑制し、かつ発色試液を安定化し及び、呈色液によるガラスセルの染着を効果的に防止する。

実施例2 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：実施例1の発色試液からゼラチンを除いた発色試液を調製する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例1と同じ。

比較表 3

ガラスセルに対する染着性

| 項目 | 例 | 実施例1 | 実施例2 |
|----|---|------|-------------|
| 結果 | | 染着無し | セル全体が淡紫色に染着 |

比較表 1, 2, 3, から明らかのように、マーシクロデキストリンは試葉盲検値の上昇を効果的に抑制し、かつ発色試液の安定化の効果を有するが、ガラスセルの染着を防止する効果は無い。

参考例1 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：実施例1の発色試液からマーシクロデキストリンを除いた発色試液を調製する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例1と同じ。

実施例2と参考例1の測定結果比較表

比較表 1

試葉盲検値の比較

| 項目 | 実施例2 | 参考例1 |
|----------------|-------|-------|
| 560nmの吸光度(水標準) | 0.081 | 0.209 |

比較表 2

ガラスセルに対する染着性

| 項目 | 実施例2 | 参考例1 |
|----|--------------|-------|
| 結果 | セル全体が淡紫色に染着。 | 染着無し。 |

比較表1,2から明らかなようにゼラチンには試薬盲検値の上昇抑制効果は無いが、ガラスセルに対する染着防止効果がある。

実施例3 血清遊離コレステロールの測定

実施例1の発色試液の調製法の従い、 β -シクロデキストリンの代りに α -シクロデキストリンを用い、これを0.3%の濃度に調製する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例1と同じ。

比較例2 血清遊離コレステロールの測定

発色試液 実施例3の発色試液からゼラチンと α -シクロデキストリンを除いた発色試液を調製する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例1と同じ。

実施例3と比較例2の測定結果比較表

比較表 1

| 項目 | 実施例3 | 比較例2 |
|----|------|------|
| 1 | 52.7 | 53.0 |
| 2 | 48.1 | 48.0 |
| 平均 | 50.4 | 50.5 |

比較表 2

試薬盲検値の比較

| 項目 | 実施例3 | 比較例2 |
|-----------|-------|-------|
| 560nmの吸光度 | 0.071 | 0.190 |

比較表 3

コレステロール標準液呈色度の比較

| 項目 | 実施例3 | 比較例2 |
|------------------------|-------|-------|
| (Estd-Eb) 560nmの吸光度 | 1.270 | 1.268 |

比較表 5

ガラスセルに対する染着性

| 項目 | 実施例3 | 比較例2 |
|----|------|-------------|
| 結果 | 染着無し | セル全体が淡紫色に染着 |

比較表 4

空氣保存に於ける発色試液の経時変化

| 保存時間 | 実施例3 | 比較例2 |
|------|------|-----------|
| 0時間 | 透明 | 透明 |
| 18時間 | 混濁 | 渾り及び少量の沈殿 |
| 48時間 | 混濁 | 渾り及び大量の沈殿 |
| 72時間 | 混濁 | 渾り及び大量の沈殿 |

手続補正書

昭和59年 8月27日

特許行政官 殿



1. 事件の表示

昭和58年特許願第95185号

2. 発明の名称

シクロデキストリンによるテトラゾリウム塩の安定化方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

登録番号 541

住所 大阪府大阪市東区通天町3丁目10番地
電話 TEL 03-376-6371

名前 和光純薬工業株式会社

代表者 一芳三生



4. 補正命令の日付

自発

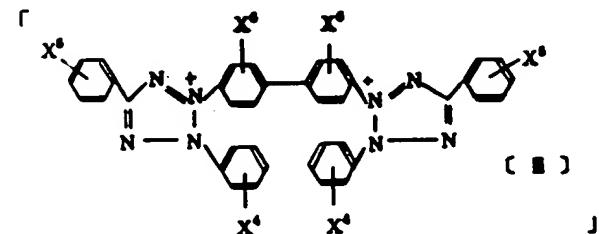
特許庁
59.8.28

法である。」と補正する。

(6) 明細書21頁3行目に記載の「セラチンを有効成分として用いる」を「セラチンを用いる」と補正する。

(7) 明細書21頁18行目から同頁19行目にかけて記載の「セラチンを有効成分として用いて」を「セラチンを用いて」と補正する。

(8) 明細書24頁1行目から同頁5行目にかけて記載の一般式〔Ⅲ〕を以下の通り補正する。



(9) 明細書24頁6行目から同頁7行目にかけて記載の「(但しX¹及びX²は、-NO₂又は-Hを表わし、X³は、-OCH₃、-I又は-Hを表わす。)」を「(但しX¹及びX²は、-NO₂又は-Hを表わし、X³は、-OCH₃、-I又は-Hを表わす。)」と補正する。

5. 補正により減少する発明の数 1

6. 補正の対象

明細書の発明の名称の欄、特許請求の範囲の欄及び発明の詳細を説明の欄。

7. 補正の内容

(1) 発明の名称の欄に記載の「シクロデキストリンによるテトラゾリウム塩の安定化方法及び安定化用試薬」を「シクロデキストリンによるテトラゾリウム塩の安定化方法」と補正する。

(2) 特許請求の範囲を別紙のとおり補正する。

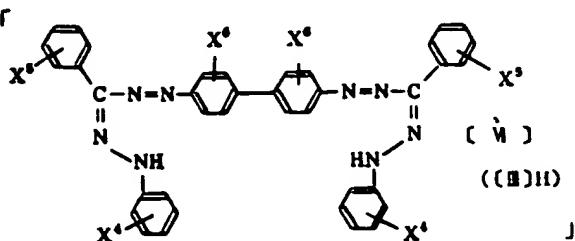
(3) 明細書19頁7行目に記載の「アーシクロデキストリンを共存」を「アーシクロデキストリンを夫々単独又は混合して共存」と補正する。

(4) 明細書19頁10行目から同頁11行目にかけて記載の「アーシクロデキストリン又はアーシクロデキストリン」を「アーシクロデキストリン又は/及びアーシクロデキストリン」と補正する。

(5) 明細書19頁15行目から同頁16行目にかけて記載の「テトラゾリウム塩の安定化方法及び試薬である。」を「テトラゾリウム塩の安定化方

と補正する。

(6) 明細書27頁1行目から同頁5行目にかけて記載の一般式〔Ⅳ〕((Ⅲ)H)を以下の通り補正する。



(7) 明細書27頁6行目から同頁7行目にかけて記載の「(但し、X¹及びX²は、-NO₂又は-Hを表わし、X³は、-OCH₃、-I又は-Hを表わす。)」を「(但し、X¹及びX²は、-NO₂又は-Hを表わし、X³は、-OCH₃、-I又は-Hを表わす。)」と補正する。

(8) 明細書29頁15行目から同頁16行目にかけて記載の「好ましい一例としては、通常、」を「好ましくは、」と補正する。

(9) 明細書30頁1行目に記載の「本発明において

特に効果的なゼラチンは、「」を「テトラゾリウム塩から還元によって生成するホルマザン化合物の測定試験材への染着を効果的に抑制するゼラチンは、「」と補正する。

04明細書30頁5行目から同頁7行目にかけて記載の「しかしながら、本発明に係るゼラチンは、その平均分子量が」を「しかしながら、本発明で用いるゼラチンは、その平均分子量が」と補正する。

04明細書30頁14行目に記載の「通常、一例、0.1～0.7重量／容量ml、」を「通常、0.1～0.7重量／容量ml、」と補正する。

04明細書30頁14行目から同頁15行目にかけて記載の「好ましくは、一例、0.2～0.5重量／容量ml」を「好ましくは、0.2～0.5重量／容量ml」と補正する。

04明細書42頁9行目に記載の「実験法は実施例1と同じ。」の次に改行して以下の文章及び表を追加する。

「実施例4 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：実施例1の発色試液の調製法に従い、

ヨーシクロデキストリンの代りに、ヨーシクロデキストリンとアーシクロデキストリン1重量：1重量の混合物 0.2gを用いる。

血清遊離コレステロールの測定：実施例1と同じ。

比較例3 血清遊離コレステロールの測定

発色試液：実施例4の発色試液からゼラチン、及びヨーシクロデキストリンとアーシクロデキストリンの混合物を除いた発色試液を調製する。

血清遊離コレステロールの測定：実施例1と同じ。

実施例4と比較例3の測定結果比較表

比較表1

血清試料測定結果

| 血清No. | 実施例4 (mg/dl) | 比較例3 (mg/dl) |
|-------|-----------------|-----------------|
| 1 | 60.5 | 61.1 |
| 2 | 48.9 | 48.3 |
| 3 | 55.2 | 54.7 |
| 4 | 35.5 | 36.1 |
| 5 | 42.6 | 42.3 |
| 平均 | 48.54 | 48.50 |

比較表2

試薬盲検液の比較

| | 実施例4 | 比較例3 |
|-----------------|-------|-------|
| 560 nmの吸光度(水対照) | 0.075 | 0.196 |

比較表3

コレステロール標準液吸光度の比較

| | 実施例4 | 比較例3 |
|---|-------|-------|
| 560 nmの吸光度(E _{std} -E _b) | 1.263 | 1.277 |

比較表4

室温保存における発色試液の経時変化

| | 実施例4 | 比較例3 |
|------|------|-----------|
| 0時間 | 透明 | 透明 |
| 18時間 | 透明 | 褐色及び少量の沈殿 |
| 48時間 | 透明 | 褐色及び大量の沈殿 |
| 72時間 | 透明 | 褐色及び大量の沈殿 |

比較表5

ガラスセルに対する染着性

| | 実施例4 | 比較例3 |
|----|------|-------------|
| 結果 | 染着無し | セル全体が淡紫色に染着 |

以上

別紙

2. 特許請求の範囲

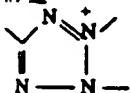
(1) β -シクロデキストリン又は/及び α -シクロデキストリンを有効成分として用いる、

部分構造

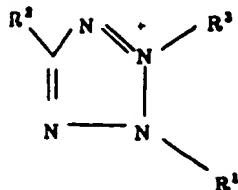


を有するテトラゾリウム塩の安定化方法。

(2) 部分構造

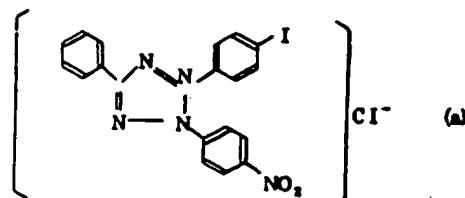


を有するテトラゾリウム塩が、一般式〔1〕で示されるモノテトラゾリウム塩である、特許請求の範囲第1項記載の安定化方法。

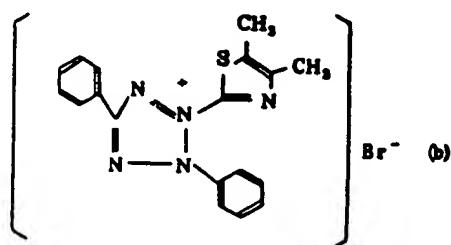


〔1〕

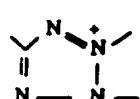
(但し、R¹、R²及びR³は有機残基を表わす。)



(5) 一般式〔1〕で示されるモノテトラゾリウム塩が、構造式(a)で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第2項記載の安定化方法。

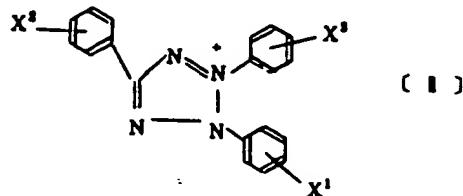


(6) 部分構造



を有するテト

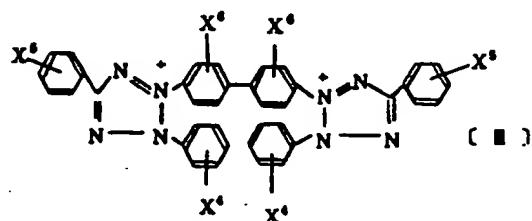
特開昭59-219270(14)
(3) 一般式〔1〕で示されるモノテトラゾリウム塩が、一般式〔1〕で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第2項記載の安定化方法。



(但し、X¹及びX²は、-NO₂又は-Hを表わし、X³は、-OCH₃、-I又は-Hを表わす。)

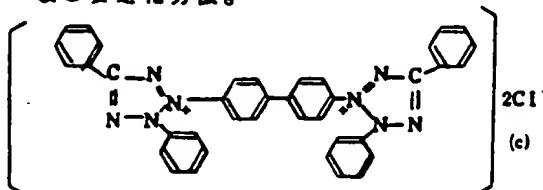
(4) 一般式〔1〕で示されるモノテトラゾリウム塩が構造式(a)で示されるモノテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第3項記載の安定化方法。

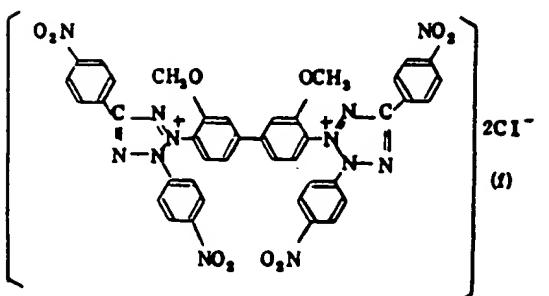
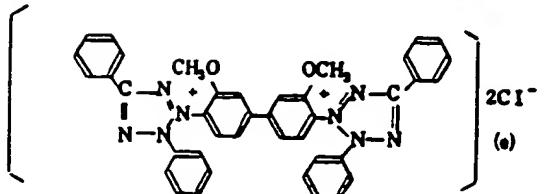
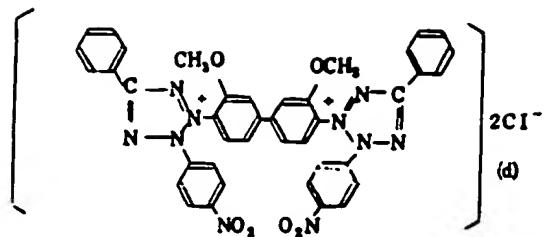
ラゾリウム塩が、一般式〔3〕で示されるジテトラゾリウム塩である特許請求の範囲第1項記載の安定化方法。



(但し、X¹及びX²は、-NO₂又は-Hを表わし、X³は-OCH₃、-I又は-Hを表わす。)

(7) 一般式〔3〕で示されるジテトラゾリウム塩が、構造式(e)乃至(f)で示されるジテトラゾリウム塩の1である特許請求の範囲第6項記載の安定化方法。





特開昭59-219270(15)

(9) 液波中のヨーククロデキストリンの濃度が
0.01~1.5重量/容量%である特許請求の範囲第8項記載の安定化方法。

(4) 液液中のアーシクロデキストリンの濃度が
0.01~1.0重量/容量%である特許請求の
範囲第8項記載の安定化方法。

(1) 液波中のヨーシクロデキストリン及びヨーシクロデキストリンの濃度が、ヨーシクロデキストリン 0.01~1.5重量/容積%、ヨーシクロデキストリン 0.01~1.0重量/容積%の範囲で任意の比率に混合した濃度である特許請求の範囲第 8 項記載の安定化方法。

四 潜液がテオール化合物及び部分構造



を有するテトラゾリウム塩及びヨーシクロデ
キストリン又はヨーシクロデキストリンを含
有して成る、安定化されたテトラゾリウム塩
溶液である、特許請求の範囲第8項、第9項、
第10項又は第11項記載の安定化方法。

03 チオール化合物及び部分構造



を有するテトラソリウム塩及びヨーコロデキストリン又はヨーコロデキストリンを含有して成る、安定化されたテトラソリウム塩溶液が、基質に作用してスーパー・オキサイドイオンを生成させる酸化酵素を含有する特許請求の範囲第1-2項記載の安定化方法。

04 タルコース、コレステロール、グリセロール、グリセロール脂肪エスチル、コリン、ア

シル CoA、ビルビン酸、尿酸、キサンテン又は乳酸を基質とし、それらの基質に作用する酸化酵素が各々グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、グリセロールオキシダーゼ、グリセロール偏酸エステルオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、アシル CoA オキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、ウリカーゼ、キサンテンオキシダーゼ又は乳酸オキシダーゼである、特許請求の範囲第 13 項配臍の安定化方法。

(4) チオール化合物が、亜元型グルタチオン、
チオグリコール酸、メルカプトエタノール、
チオサリチル酸、システアミン、システイン、
ジメルカプトコハク酸である特許請求の範囲
第1-3項又は第1-3項記載の安定化方法。

94 基質又は酸化酵素が被検試料中の基質又は
酸化酵素である、特許請求の範囲第13項又
は第14項記載の安定化方法。

基質又は酸化酵素が体液成分である、特許請求の範囲第1-6項記載の安定化方法。

手続補正書

特開昭53-219270(16)

昭和59年 8月 29日

特許庁長官 瞳

1 事件の表示

昭和58年特許願第95185号

2 発明の名称

シクロデキストリンによるアラブリウム塩の安定化方法

3 補正をする者

事件との関係 特許出願人

特許番号 541

住所 大阪府大阪市東区道頓堀町3丁目10番地
電話 TEL 03-270-6571

名称 和光純工業株式会社

代表者 一力一生



4 補正の令の日付

自発



5 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄。

6 補正の内容

(1)明細書 31頁11行目に記載の「システィン又はジメルカブトコハク酸が」を「システィン、ジメルカブトコハク酸、又はコエンザイムA(CoA)が」と補正する。

以上